(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2001年10月18日 (18.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/77325 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q 1/68, A61K 45/00, A61P 25/00, 29/00, 35/00, 11/06, 9/00, G01N 33/53, 33/566, 33/15, 33/50 // C12P 21/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03143

(22) 国際出願日: 2001年4月12日 (12.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-110765 2000年4月12日 (12.04.2000) JP

(71) 出願人 *(米国を除く全ての指定国について)*: 武田薬品工業株式会社 (**TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.**) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 *(米国についてのみ)*: 三輪真敬 (**MIWA, Masanori**) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代3丁目12番地1 武田松代レジデンス513号 Ibaraki (JP). 松井英起 (**MATSUI, Hideki**) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県つくば市並木4丁目16番地1 ガーデンヒルズ並木708号 Ibaraki (JP). 新谷 靖 (**SHINTANI, Yasushi**) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ703号 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 青山 葆, 外(**AOYAMA, Tamotsu et al.**); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 *(国内)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 *(広域)*: ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

(57) Abstract: A novel G protein-coupled receptor protein having an amino acid sequence, which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, and its salt which are useful in, for example, screening agonists/antagonists; a polynucleotide encoding the same; and use thereof in medicines, etc.

(57) 要約:

本発明は、アゴニスト／アンタゴニストのスクリーニング等に有用な配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするポリヌクレオチドを提供する。それらの医薬用等の用途も提供する。

WO 01/77325 A1

Roman Artymyshyn, et al.
Serial No.: Not Yet Known
Filed: Herewith
Title: DNA Encoding SNORF138 And Uses Thereof

Exhibit 5

明　細　書

新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのＤＮＡ

技術分野

本発明は、ヒト脾臓由来の新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするＤＮＡに関する。

背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役している guanine nucleotide-binding protein（以下、Ｇ蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また、７個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは７回膜貫通型レセプター蛋白質（７ＴＭＲ）と総称される。

Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にはＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未だ未

知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、ｃＤＮＡの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたｃＤＮＡの断片配列がExpressed Sequence Tag（ＥＳＴ）としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのＥＳＴは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

従来、Ｇ蛋白質共役型レセプターと生理活性物質（すなわち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（すなわち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その遺伝子（例えばｃＤＮＡ）をクローニングすることは、新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

しかし、Ｇ蛋白質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のＧ蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなＧ蛋白質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

Ｇ蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質（すなわち、リガンド）の探索、また、該レセプターに対するアゴニ

ストまたはアンタゴニスト）の探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防／治療薬や診断薬に応用することもできる。

本発明は、上記のように有用な新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を提供するものである。すなわち、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）を含有するポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物、該G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られうるリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニス

ト）またはその塩、およびリガンドと該Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト脾臓由来の新規なＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするｃＤＮＡを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第１～第７膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのｃＤＮＡにコードされる蛋白質が７回膜貫通型のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

（１）配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

（２）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

（３）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

（４）ＤＮＡである上記（３）記載のポリヌクレオチド、

（５）配列番号：２で表される塩基配列を有する上記（３）記載のポリヌクレオチド、

（６）上記（３）記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

（７）上記（６）記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

（８）上記（７）記載の形質転換体を培養し、上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、

（９）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

（１０）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記（９）記載の抗体、

（１１）上記（９）記載の抗体を含有してなる診断薬、

（１２）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド、

（１３）上記（１２）記載のＧ蛋白質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬、

（１４）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

（１５）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（１６）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（１７）上記（１５）記載のスクリーニング方法または上記（１６）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（１８）上記（１５）記載のスクリーニング方法または上記（１６）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（１９）上記（３）記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

（２０）上記（３）記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、

（２１）上記（３）記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質のｍＲＮＡの定量方法、

（２２）上記（９）記載の抗体を用いることを特徴とする上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法、

（２３）上記（２１）または上記（２２）記載の定量方法を用いることを特徴とする上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断方法、

（２４）上記（２１）記載の定量方法を用いることを特徴とする上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２５）上記（２２）記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２６）上記（２４）記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩、

（２７）上記（２５）記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩、

（２８）上記（２４）記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（２９）上記（２５）記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物

またはその塩を含有してなる医薬、

（３０）中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療剤である上記（１８）、（２８）または（２９）記載の医薬、

（３１）哺乳動物に対して、上記（１５）記載のスクリーニング方法または上記（１６）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療方法、

（３２）哺乳動物に対して、上記（２４）記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療方法、

（３３）哺乳動物に対して、上記（２５）記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療方法、

（３４）中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療剤を製造するための上記（１５）記載のスクリーニング方法または上記（１６）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用、

（３５）中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療剤を製造するための上記（２４）記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の使用、

（３６）中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療剤を製造するための上記（２５）記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の使用等に関する。

さらには、

（３７）蛋白質が、①配列番号：１で表わされるアミノ酸配列、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：１で表わされるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

（３８）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記（１４）記載のリガンドの決定方法、

（３９）リガンドが、例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドＹ、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、ＧＨＲＨ、ＣＲＦ、ＡＣＴＨ、ＧＲＰ、ＰＴＨ、ＶＩＰ（バソアクティブ　インテスティナル　ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、ＣＧＲＰ（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ－ケモカイン（chemokine）（例えば、ＩＬ－８、ＧＲＯα、ＧＲＯβ、ＧＲＯγ、ＮＡＰ－２、ＥＮＡ－７８、ＰＦ４、ＩＰ１０、ＧＣＰ－２、ＭＣＰ－１、ＨＣ１４、ＭＣＰ－３、Ｉ－３０９、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ－１β、ＲＡＮＴＥＳなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、ＴＲＨ、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（ＬＰＡ）、スフィンゴシン１－リン酸またはコレス

テロール代謝関連物質である上記（３８）記載のリガンドの決定方法、

（４０）（ｉ）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、（ii）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記（１５）記載のスクリーニング方法、

（４１）（ｉ）標識したリガンドを上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（４２）（ｉ）標識したリガンドを上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（４３）（ｉ）標識したリガンドを上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物

またはその塩のスクリーニング方法、

（４４）（ｉ）標識したリガンドを上記（７）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（７）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（４５）（ｉ）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（４６）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記（７）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（７）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（４７）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グル

タミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ　インテスティナル　ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ－ケモカイン（chemokine）（例えば、IL－8、GROα、GROβ、GROγ、NAP－2、ENA－78、PF4、IP10、GCP－2、MCP－1、HC14、MCP－3、I－309、MIP1α、MIP－1β、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1－リン酸またはコレステロール代謝関連物質である上記（45）または（46）記載のスクリーニング方法、

（48）上記（40）～（47）記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（49）上記（40）～上記（47）記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

（50）上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記（16）記載のスクリーニング用キット、

（51）上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記（16）記載のスクリーニング用キット、

（52）上記（7）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有することを特徴とする上記（16）記載のスクリーニング用キット、

（53）上記（50）～（52）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはそ

の塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（５４）上記（５０）～（５２）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（1）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

（５５）上記（9）記載の抗体と、上記（1）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記（1）のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

（５６）上記（9）記載の抗体と、被検液および標識化された上記（1）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記（1）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記（1）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および

（５７）被検液と担体上に不溶化した上記（9）記載の抗体および標識化された上記（9）記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記（1）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法等を提供する。

図面の簡単な説明

図１は、実施例１で得られたＴＧＲ５をコードするｃＤＮＡの塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列（一文字表記）を示す。

図２は、実施例１で得られたＴＧＲ５をコードするｃＤＮＡの塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列（一文字表記）を示す（図１に続く）。

図３は、実施例１で得られたＴＧＲ５をコードするｃＤＮＡの塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列（一文字表記）を示す（図２に続く）。

図４は、実施例１で得られたＴＧＲ５をコードするｃＤＮＡの塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列（一文字表記）を示す（図３に続く）。

図５は、ＴＧＲ５の疎水性プロット図である。

図６は、ＴＧＲ５のヒト組織における発現分布を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質（以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある）は、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列（図１～図４中のアミノ酸配列）と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と約５０％以上、好ましくは約６０％以上、より好ましくは約７０％以上、さらに好ましくは約８０％以上、なかでも好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有す

るアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約０．０１～１００倍、好ましくは約０．５～２０倍、より好ましくは約０．５～２倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：１で表わされるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がＮ末端（アミノ末端）、右端がＣ末端（カルボキシル末端）である。配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプター蛋白質は、Ｃ末端が通常カルボキシル基（$-COOH$）またはカルボキシレート（$-COO^-$）であるが、Ｃ末端がアミド（$-CONH_2$）または

エステル（－ＣＯＯＲ）であってもよい。

ここでエステルにおけるＲとしては、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピルもしくはｎ－ブチルなどのC_{1-6}アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC_{3-8}シクロアルキル基、例えば、フェニル、α－ナフチルなどのC_{6-12}アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル－C_{1-2}アルキル基もしくはα－ナフチルメチルなどのα－ナフチル－C_{1-2}アルキル基などのC_{7-14}アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質がＣ末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したＣ末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記した蛋白質において、Ｎ末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC_{2-6}アルカノイル基などのC_{1-6}アシル基など）で保護されているもの、Ｎ端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、－ＯＨ、－ＳＨ、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC_{2-6}アルカノイル基などのC_{1-6}アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のレセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白

質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも２０個以上、好ましくは５０個以上、より好ましくは１００個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約５０％以上、好ましくは約６０％以上、より好ましくは約７０％以上、さらに好ましくは約８０％以上、なかでも好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質のレセプター活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質のレセプター活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは１～５個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはＣ末端が通常カルボキシル基（$-COOH$）またはカルボキシレート（$-COO^-$）であるが、上記した本発明の蛋白質のごとく、Ｃ末端がアミド（$-CONH_2$）またはエステル（$-COOR$）であってもよい。本発明の部分ペプチドがＣ末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したＣ末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のレセプター蛋白質と同

様に、Ｎ末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、Ｎ端側が生体内で切断され生成したＧｌｎがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載する蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、４－ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、４－メチルベンズヒドリルアミン樹脂、ＰＡＭ樹脂、４－ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、４－（２'，４'－ジメトキシフェニル－ヒドロキシメチル）フェノキシ樹脂、４－（２'，４'－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃアミノエチル）フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、α－アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮

合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N，N'－ジイソプロピルカルボジイミド、N－エチル－N'－（3－ジメチルアミノプロリル）カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBｔ、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBｔエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N，N－ジメチルホルムアミド，N，N－ジメチルアセトアミド，N－メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン，クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン，ジオキサン，テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル，プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル，酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約－２０℃～５０℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常１．５～４倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Ｂｏｃ、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、４－メトキシベンジルオキシカルボニル、Ｃｌ－Z、Ｂｒ－Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフ

ルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、２－ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Ｆｍｏｃなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、２－アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、４－ニトロベンジルエステル、４－メトキシベンジルエステル、４－クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ｔ－ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Ｂｚｌ、$\mathrm{Cl_2}$－Ｂｚｌ、２－ニトロベンジル、Ｂｒ－Ｚ、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Ｔｏｓ、４－メトキシ－２，３，６－トリメチルベンゼンスルホニル、ＤＮＰ、ベンジルオキシメチル、Ｂｕｍ、Ｂｏｃ、Ｔｒｔ、Ｆｍｏｃなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、２，４，５－トリクロロフェノール、２，４－ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、ＨＯＮＢ、Ｎ－ヒドロキシスクシミド、Ｎ－ヒドロキシフタルイミド、ＨＯＢｔ）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Ｐｄ－黒あるいはＰｄ－炭素な

どの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約－２０℃～４０℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、１，４－ブタンジチオール、１，２－エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる２，４－ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の１，２－エタンジチオール、１，４－ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端のα－アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、 蛋白質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列（ＤＮＡまたはＲＮＡ、好ましくはＤＮＡ）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡ、ｍＲＮＡ等のＲＮＡであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＲＮＡまたはＤＮＡ：ＲＮＡのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すなわち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新ＰＣＲとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のレセプター蛋白質のｍＲＮＡを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡとしては、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、上記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、上記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotalＲＮＡまたはｍＲＮＡ画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、ＲＴ-ＰＣＲ法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：２で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：２で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２で表わされる塩基配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）２nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約１９～４０

mM、好ましくは約１９～２０mMで、温度が約５０～７０℃、好ましくは約６０～６５℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約１９mMで温度が約６５℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：２で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列の一部、または該ＤＮＡと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡを包含するだけではなく、ＲＮＡをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子のＲＮＡとハイブリダイズすることができ、該ＲＮＡの合成または機能を阻害することができるか、あるいはＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質関連ＲＮＡとの相互作用を介してＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質関連ＲＮＡの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質関連ＲＮＡと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の５’端ヘアピンループ、５’端６－ベースペア・リピート、５’端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、Ｏ

ＲＦ翻訳開始コドン、３’端非翻訳領域、３’端パリンドローム領域、および３’端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、２－デオキシ－Ｄ－リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、Ｄ－リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のＮ－グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはＤＮＡやＲＮＡ中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、２本鎖ＤＮＡ、１本鎖ＤＮＡ、２本鎖ＲＮＡ、１本鎖ＲＮＡ、さらにＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、１個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ－Ｌ－リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、αアノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでな

く、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、１個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、ＲＮＡ、ＤＮＡ、あるいは修飾された核酸（ＲＮＡ、ＤＮＡ）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の３’端あるいは５’端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付

着させることができうる。その他の基としては、核酸の３’端あるいは５’端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、ＲＮａｓｅなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、上記した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、上記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、上記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりｍＲＮＡ画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、ＲＴ－ＰＣＲ法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、（１）配列番号：２で表わされる塩基配列を有するＤＮＡの部分塩基配列を有するＤＮＡ、または（２）配列番号：２で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするＤＮＡの部分塩基配列を有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：２で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２で表わされる塩基配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有

する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある）を完全にコードするＤＮＡのクローニングの手段としては、本発明のレセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成ＤＮＡプライマーを用いてＰＣＲ法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだＤＮＡを本発明のレセプター蛋白質の一部あるいは全領域をコードするＤＮＡ断片もしくは合成ＤＮＡを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）２nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

ＤＮＡの塩基配列の変換は、ＰＣＲや公知のキット、例えば、Ｍｕｔａｎ^{TM}－super Express Km（宝酒造（株））、Ｍｕｔａｎ^{TM}－Ｋ（宝酒造（株））などを用いて、ＯＤＡ－ＬＡ ＰＣＲ法、Gapped duplex法、Kunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたレセプター蛋白質をコードするＤＮＡは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該ＤＮＡはその５’末端側に翻訳開始コドンとしてのＡＴＧを有し、また３’末端側には翻訳終止コドンとしてのＴＡＡ、ＴＧＡまたはＴＡＧを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成ＤＮＡアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡから目的とするＤＮＡ断片を切り出し、（ロ）該ＤＮＡ断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、ｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＵＣ１２、ｐＵＣ１３）、枯草菌由来のプラスミド（例、ｐＵＢ１１０、 ｐＴＰ５、ｐＣ１９４）、酵母由来プラスミド（例、ｐＳＨ１９、ｐＳＨ１５）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、ｐＡ１－１１、ｐＸＴ１、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐＲｃ／ＲＳＶ、ｐｃＤＮＡＩ／Ｎｅｏなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、ＳＲαプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＬＴＲプロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＨＳＶ-ＴＫプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、ＣＭＶプロモーター、ＳＲαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｒｅｃＡプロモーター、λP_Lプロモーター、ｌｐｐプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、ＳＰＯ１プロモーター、ＳＰＯ２プロモーター、ｐｅｎＰプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、Ｐ１０プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、選択マーカー、ＳＶ４０複製オリジン（以下、ＳＶ４０ｏｒｉと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、ｄｈｆｒと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（ＭＴＸ）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Ａｍｐ^{r}と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Ｎｅｏ^{r}と略称する場合がある、Ｇ４１８耐性）等が挙げられる。特に、ＣＨＯ（ｄｈｆｒ$^-$）細胞を用いてｄｈｆｒ遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のＮ端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoＡ・シグナル配列、OmpＡ・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α－アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母

である場合は、ＭＦα・シグナル配列、ＳＵＣ２・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α－インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）Ｋ１２・ＤＨ１〔プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA），６０巻，１６０（１９６８）〕，ＪＭ１０３〔ヌクイレック・アシッズ・リサーチ，（Nucleic Acids Research），９巻，３０９（１９８１）〕，ＪＡ２２１〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular Biology）〕，１２０巻，５１７（１９７８）〕，ＨＢ１０１〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー，４１巻，４５９（１９６９）〕，Ｃ６００〔ジェネティックス（Genetics），３９巻，４４０（１９５４）〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス（Bacillus subtilis）ＭＩ１１４〔ジーン，２４巻，２５５（１９８３）〕，２０７－２１〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Journal of Biochemistry），９５巻，８７（１９８４）〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス　セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）ＡＨ２２，ＡＨ２２Ｒ$^-$，ＮＡ８７－１１Ａ，ＤＫＤ－５Ｄ、２０Ｂ－１２、シゾサッカロマイセス　ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）ＮＣＹＣ１９１３，ＮＣＹＣ２０３６、ピキア　パストリス（Pichia pastoris）などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがＡｃＮＰＶの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞（Spodoptera frugiperda cell；Ｓｆ細胞）、Trichoplusia niの中腸由来のＭＧ１細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five^{TM}細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイ

ルスがＢｍＮＰＶの場合は、蚕由来株化細胞（Bombyx mori N；ＢｍＮ細胞）などが用いられる。該Ｓｆ細胞としては、例えば、Ｓｆ９細胞（ATCC CRL1711）、Ｓｆ２１細胞（以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ（In Vivo）,13, 213-217,(1977)）などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー（Nature），３１５巻，５９２(１９８５)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞ＣＯＳ－７，Ｖｅｒｏ，チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ細胞と略記）、ｄｈｆｒ遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ（ｄｈｆｒ$^-$）細胞と略記）、マウスＬ細胞，マウスＡｔＴ－２０、マウスミエローマ細胞、ラットＧＨ３、ヒトＦＬ細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），６９巻，２１１０(１９７２)やジーン（Gene），１７巻，１０７(１９８２)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス（Molecular & General Genetics），１６８巻，１１１(１９７９)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メッソズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology），１９４巻，１８２－１８７（１９９１）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA），７５巻，１９２９(１９７８）などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー（Bio/Technology）,6, 47-55(1988)）などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊８新細胞工学実験プロトコール．２６３－２６７（１９９５）（秀潤社発行）、ヴィロロジー

(Virology)，５２巻，４５６(１９７３)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするＤＮＡを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のｐＨは約５～８が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むＭ９培地〔ミラー (Miller)，ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics)，４３１－４３３，Cold Spring Harbor Laboratory，New York １９７２〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、３β－インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約１５～４３℃で約３～２４時間行ない、必要により、通気や撹拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約３０～４０℃で約６～２４時間行ない、必要により通気や撹拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian，K. L. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)，７７巻，４５０５(１９８０)〕や0.５％カザミノ酸を含有するＳＤ培地〔Bitter，G. A. ら、「プロシージングズ・

オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），８１巻，５３３０（１９８４）〕が挙げられる。培地のｐＨは約５～８に調整するのが好ましい。培養は通常約２０℃～３５℃で約２４～７２時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium（Grace, T.C.C.，ネイチャー（Nature），195,788(1962)）に非動化した１０％ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のｐＨは約６．２～６．４に調整するのが好ましい。培養は通常約２７℃で約３～５日間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約５～２０％の胎児牛血清を含むＭＥＭ培地〔サイエンス（Science），１２２巻，５０１(１９５２)〕，ＤＭＥＭ培地〔ヴィロロジー（Virology），８巻，３９６(１９５９)〕，ＲＰＭＩ １６４０培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション（The Journal of the American Medical Association）１９９巻，５１９(１９６７)〕，１９９培地〔プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン（Proceeding of the Society for the Biological Medicine），７３巻，１(１９５０)〕などが用いられる。ｐＨは約６～８であるのが好ましい。培養は通常約３０℃～４０℃で約１５～６０時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のレセプター蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、

トリトンＸ－１００^{TM}などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるレセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するレセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本

発明のレセプター蛋白質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（ａ）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプター蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常２～６週毎に１回ずつ、計２～１０回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の２～５日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature)、２５６巻、４９５頁（１９７５年）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはＰＥＧが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、ＮＳ－１、Ｐ３Ｕ１、ＳＰ２／０などが挙げられるが、Ｐ３Ｕ１が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は１：１～２０：１程度であり、ＰＥＧ（好ましくは、ＰＥＧ１０００～ＰＥＧ６０００）が１０～８０％程度の濃度で添加され、約２０～４０℃、好ましくは約３０～３７℃で約１～１０分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインＡを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインＡを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、１～２０％、好ましくは１０～２０％の牛胎児血清を含むＲＰＭＩ １６４０培地、１～１０％の牛胎児血清を含むＧＩＴ培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（ＳＦＭ－１０１、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常２０～４０℃、好ましくは約３７℃である。培養時間は、通常５日～３週間、好ましくは１週間～２週間である。培養は、通常５％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（ｂ）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、ＤＥＡＥ）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインＡあるいはプロテインＧなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にし

たがって製造することができる。例えば、免疫抗原（レセプター蛋白質等の抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン１に対し、約０．１～２０、好ましくは約１～５の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約２～６週毎に１回ずつ、計約３～１０回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、および該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするＤＮＡは、（１）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、（２）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患

の予防および／または治療剤、（３）遺伝子診断剤、（４）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、（５）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（６）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法、（７）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法、（８）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（９）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、（１０）細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、（１１）細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（１２）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による中和、（１３）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするＤＮＡを有する非ヒト動物の作製などに用いることができる。

特に、本発明の組換え型Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なＧ蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記する場合がある）、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするＤＮＡ（以下、本発明のＤＮＡと略記する場合がある）および本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

（１）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニス

ト）の決定

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、ＧＨＲＨ、ＣＲＦ、ＡＣＴＨ、ＧＲＰ、ＰＴＨ、ＶＩＰ（バソアクティブ　インテスティナル　アンド　リレイテッド　ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、ＣＧＲＰ（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβーケモカイン（chemokine）（例えば、ＩＬ－８、ＧＲＯα、ＧＲＯβ、ＧＲＯγ、ＮＡＰ－２、ＥＮＡ－７８、ＰＦ４、ＩＰ１０、ＧＣＰ－２、ＭＣＰ－１、ＨＣ１４、ＭＣＰ－３、Ｉ－３０９、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ－１β、ＲＡＮＴＥＳなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、ＴＲＨ、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（ＬＰＡ）、スフィンゴシン１－リン酸、コレステロール代謝関連物質（例えば、コール酸、リトコール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸、グリコケノデオキシコール酸、エピアンドロステロン、（＋）－４－アンドロステン－３，１７－ジオン、シスーアンドロステロン、１１β－ヒドロキシプロゲステロン、１７α－ヒドロキシプロゲステロン、１１－デオキシコルチコステロン、１１－デオキシコルチゾール、デヒドロイソアンドロステロン、３α－ヒドロキシ－５α－プレグナン－２０－オン、４－プレグネン－２０α－オール－３

ーオン、５αーデヒドロテストステロン、テストステロン、プロゲステロンおよびこれらの塩など）など）の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。好ましくはコレステロール代謝関連物質である。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓ活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、上記した本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、上記の発現方法が用いられるが、該レセプター蛋白質をコードするＤＮＡを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするＤＮＡ断片

には、通常、相補ＤＮＡが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成ＤＮＡを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡ断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該ＤＮＡ断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus；ＮＰＶ）のポリヘドリンプロモーター、ＳＶ４０由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、ＳＲαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.），267巻，19555～19559頁，1992年〕に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter－Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力によ

る分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速（５００ｒｐｍ～３０００ｒｐｍ）で短時間（通常、約１分～１０分）遠心し、上清をさらに高速（１５０００ｒｐｍ～３００００ｒｐｍ）で通常３０分～２時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、１細胞当たり１０^3～１０^8分子であるのが好ましく、１０^5～１０^7分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の①～③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、〔^{3}H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{35}S〕などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、ＧＨＲＨ、ＣＲＦ、ＡＣＴＨ、ＧＲＰ、ＰＴＨ、ＶＩＰ（バソアクティブ　インテスティナル　アンド　リイテッド　ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、ＣＧＲＰ（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ－ケモカイン（chemokine）（例えば、ＩＬ－８、ＧＲＯα、ＧＲＯβ、ＧＲＯγ、ＮＡＰ－２、ＥＮＡ－７８、ＰＦ４、ＩＰ１０、ＧＣＰ－２、ＭＣＰ－１、ＨＣ１４、ＭＣＰ－３、Ｉ－３０９、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ－１β、ＲＡＮＴＥＳなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、

ヒスタミン、ニューロテンシン、ＴＲＨ、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（ＬＰＡ）、スフィンゴシン１－リン酸、コレステロール代謝関連物質（例えば、コール酸、リトコール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸、グリコケノデオキシコール酸、エピアンドロステロン、（＋）－４－アンドロステン－３，１７－ジオン、シス－アンドロステロン、１１β－ヒドロキシプロゲステロン、１７α－ヒドロキシプロゲステロン、１１－デオキシコルチコステロン、１１－デオキシコルチゾール、デヒドロイソアンドロステロン、３α－ヒドロキシ－５α－プレグナン－２０－オン、４－プレグネン－２０α－オール－３－オン、５α－デヒドロテストステロン、テストステロン、プロゲステロンおよびこれらの塩など）などが好適である。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、ｐＨ４～１０（望ましくはｐＨ６～８）のリン酸バッファー、トリス－塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、ＣＨＡＰＳ、Ｔｗｅｅｎ－８０™（花王－アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるリセプターやリガンドの分解を抑える目的でＰＭＳＦ、ロイペプチン、Ｅ－６４（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。０．０１ｍｌ～１０mlの該レセプター溶液に、一定量（５０００ｃｐｍ～５０００００ｃｐｍ）の〔^{3}H〕、〔^{125}Ｉ〕、〔^{14}Ｃ〕、〔^{35}Ｓ〕などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（ＮＳＢ）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約０℃～５０℃、望ましくは約４℃～３７℃で、約２０分～２４時間、望ましくは約３０分～３時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンタ

ーあるいはγーカウンターで計測する。全結合量（Ｂ）から非特異的結合量（ＮＳＢ）を引いたカウント（Ｂ－ＮＳＢ）が０ｃｐｍを越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の④～⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、ｃＡＭＰ産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

１．リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、０．０５％のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径０．４５μｍのフィルターで濾過滅菌し、４℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたＣＨＯ細胞を、１２穴プレートに５×１０^{5}個／穴で継代し、３７℃、５％ＣＯ$_2$、９５％ａｉｒで２日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の〔^{3}H〕、〔^{125}Ｉ〕、〔^{14}Ｃ〕、〔^{35}Ｓ〕などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを４℃あるいは－２０℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて１μＭに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、ＤＭＳＯ、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを１００～１０００倍濃い濃度に調製する。

２．測定法

①１２穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現ＣＨＯ細胞を、測定用緩衝液１ｍｌで２回洗浄した後、４９０μｌの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を５μｌ加え、室温にて１時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を５μｌ加えておく。

③反応液を除去し、１ｍｌの洗浄用緩衝液で３回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を０．２Ｎ　ＮａＯＨ－１％ＳＤＳで溶解し、４ｍｌの液体シンチレーターＡ（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドＹ、オピオイド、プリ

ン、バソプレッシン、オキシトシン、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、ＧＨＲＨ、ＣＲＦ、ＡＣＴＨ、ＧＲＰ、ＰＴＨ、ＶＩＰ（バソアクティブ　インテスティナル　アンド　リレイテッド　ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、ＣＧＲＰ（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ－ケモカイン（chemokine）（例えば、ＩＬ－８、ＧＲＯα、ＧＲＯβ、ＧＲＯγ、ＮＡＰ－２、ＥＮＡ－７８、ＰＦ４、ＩＰ１０、ＧＣＰ－２、ＭＣＰ－１、ＨＣ１４、ＭＣＰ－３、Ｉ－３０９、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ－１β、ＲＡＮＴＥＳなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、ＴＲＨ、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（ＬＰＡ）、スフィンゴシン１－リン酸、コレステロール代謝関連物質（例えば、コール酸、リトコール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸、グリコケノデオキシコール酸、エピアンドロステロン、（＋）－４－アンドロステン－３，１７－ジオン、シス－アンドロステロン、１１β－ヒドロキシプロゲステロン、１７α－ヒドロキシプロゲステロン、１１－デオキシコルチコステロン、１１－デオキシコルチゾール、デヒドロイソアンドロステロン、３α－ヒドロキシ－５α－プレグナン－２０－オン、４－プレグネン－２０α－オール－３－オン、５α－デヒドロテストステロン、テストステロン、プログステロンおよびこれらの塩など）などが用いられる。

（２）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤

上記（１）の方法において、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするＤＮＡを、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない（該レセプター蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明のレセプター蛋白質を該患者に投与し該レセプター蛋白質の量を補充したり、②（イ）本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。すなわち、本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として有用である。

本発明のレセプター蛋白質は、Ｇ蛋白共役型レセプター蛋白質であるヒト型ＥＤＧ６受容体にアミノ酸配列レベルで約２６％の相同性が認められる新規７回膜貫通型受容体蛋白質である。

本発明のレセプター蛋白質は中枢疾患(例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、炎症性疾患(例えば、アレルギー、喘息、リュウマチなど)、循環器疾患(例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等)、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）、糖尿病、免疫系疾患（例えば、自己免疫疾患、免疫不全等）、肝臓・胆のう疾患（例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等）、消化管疾患（例えば、潰瘍、腸炎、吸収不良等）、肥満、摂食障害などの予防および／または治療に有用である。

本発明のレセプター蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡ（以下、本発明のＤＮＡと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のＤＮＡを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のＤＮＡは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのよ

うなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするＤＮＡは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするＤＮＡを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート８０™、ＨＣＯ－５０）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイ

ンなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明のレセプター蛋白質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．１ｍｇ～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

本発明のＤＮＡの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．１ｍｇ～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（３）遺伝子診断剤

本発明のＤＮＡは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルな

ど）における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするＤＮＡまたはｍＲＮＡの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該ＤＮＡまたはｍＲＮＡの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該ＤＮＡまたはｍＲＮＡの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のＤＮＡを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやＰＣＲ－ＳＳＣＰ法（ゲノミックス（Genomics），第５巻，８７４～８７９頁（１９８９年）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第８６巻，２７６６～２７７０頁（１９８９年））などにより実施することができる。

（４）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のＤＮＡは、プローブとして用いることにより、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、（ｉ）非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞、または（ii）形質転換体等に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのｍＲＮＡ量を測定することによる、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのｍＲＮＡ量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

（ｉ）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

得られた細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのｍＲＮＡは、例えば、通常の方法により細胞等からｍＲＮＡを抽出し、例えば、TaqManPCRなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の手段によりノザンブロットを行うことにより解析することもできる。

（ii）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのｍＲＮＡを同様にして定量、解析することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

（ｉ）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（３０分前～２４時間前、好ましくは３０分前～１２時間前、より好ましくは１時間前～６時間前）もしくは一定時間後（３０分後～３日後、好ましくは１時間後～２日後、より好ましくは１時間後～２４時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（３０分後～３日後、好ましくは１時間後～２日後、より好ましくは１時間後～２４時間後）、細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのｍＲＮＡ量を定量、解析することにより行なうことができ、

（ii）形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（１日後～７日後、好ましくは１日後～３日後、より好ましくは２日後～３日後）、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのｍＲＮＡ量を定量、解析することにより行なうことができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、Ｇ蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca^{2+}遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下など

を促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、（ロ）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば、高血圧患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（５）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させ

る化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、

エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート８０™、ＨＣＯ－５０）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（６）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明のレセプター蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以

下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和４９年発行）

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和５４年発行）

（７）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法

本発明のレセプター蛋白質等を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（イ）Ｇ蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、（ｉ）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該リガンドとしては、例えば、、コレステロール代謝関連物質（例えば、コー

ル酸、リトコール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸、グリコケノデオキシコール酸、エピアンドロステロン、（＋）－４－アンドロステン－３，１７－ジオン、シス－アンドロステロン、１１β－ヒドロキシプロゲステロン、１７α－ヒドロキシプロゲステロン、１１－デオキシコルチコステロン、１１－デオキシコルチゾール、デヒドロイソアンドロステロン、３α－ヒドロキシ－５α－プレグナン－２０－オン、４－プレグネン－２０α－オール－３－オン、５α－デヒドロテストステロン、テストステロン、プロゲステロンおよびこれらの塩など）などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法においては、（ｉ）と（ii）の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比

較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質等が得られる以前は、Ｇ蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後に該候補化合物が実際にヒトのＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認

する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、上記した本発明のレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質等などが適している。

本発明のレセプター蛋白質等を製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のＤＮＡを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするＤＮＡ断片には相補ＤＮＡが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成ＤＮＡを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするＤＮＡ断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該ＤＮＡ断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus；ＮＰＶ）のポリヘドリンプロモーター、ＳＶ４０由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、ＳＲαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.），267巻，19555～

19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter－Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速（５００ｒｐｍ～３０００ｒｐｍ）で短時間（通常、約１分～１０分）遠心し、上清をさらに高速（１５０００ｒｐｍ～３００００ｒｐｍ）で通常３０分～２時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質等を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、１細胞当たり１０^3～１０^8分子であるのが好ましく、１０^5～１０^7分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の①～③を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋

白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば〔^{3}H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{35}S〕などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、ｐＨ４～１０（望ましくはｐＨ６～８）のリン酸バッファー、トリス－塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、ＣＨＡＰＳ、Tween－８０^{TM}（花王－アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でＰＭＳＦ、ロイペプチン、Ｅ－６４（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。０．０１ｍｌ～１０ｍｌの該レセプター溶液に、一定量（５０００ｃｐｍ～５０００００ｃｐｍ）の標識したリガンドを添加し、同時に１０$^{-4}$M～１０$^{-10}$Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（ＮＳＢ）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約０℃から５０℃、望ましくは約４℃から３７℃で、約２０分から２４時間、望ましくは約３０分から３時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ－カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（Ｂ$_0$）から非特異的結合量（ＮＳＢ）を引いたカウント（Ｂ$_0$－ＮＳＢ）を１００％とした時、特異的結合量（Ｂ－ＮＳＢ）が、例えば、５０％以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする上記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、ｃＡＭＰ産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、上記の組換え型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

１．スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、０．０５％のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径０．４５μｍのフィルターで濾過滅菌し、４℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②Ｇ蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたＣＨＯ細胞を、１２穴プレートに５×１０^{5}個／穴で継代し、３７℃、５％ＣＯ$_{2}$、９５％ａｉｒで２日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の〔^{3}H〕、〔^{125}Ｉ〕、〔^{14}Ｃ〕、〔^{35}Ｓ〕などで標識したリガンド

水溶液の状態のものを４℃あるいは－２０℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて１μMに希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを０．１％ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むＰＢＳで１mMとなるように溶解し、－２０℃で保存する。

２．測定法

①１２穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現ＣＨＯ細胞を、測定用緩衝液１ｍｌで２回洗浄した後、４９０μｌの測定用緩衝液を各穴に加える。

②１０$^{-3}$～１０$^{-10}$Mの試験化合物溶液を５μｌ加えた後、標識リガンドを５μｌ加え、室温にて１時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに１０$^{-3}$Mのリガンドを５μｌ加えておく。

③反応液を除去し、１ｍｌの洗浄用緩衝液で３回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを０．２Ｎ　ＮａＯＨ－１％ＳＤＳで溶解し、４ｍｌの液体シンチレーターＡ（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding（ＰＭＢ）を次の式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB：Percent Maximum Binding

B　：検体を加えた時の値

NSB：Non-specific Binding（非特異的結合量）

B_0　：最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）Ｇ蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（８）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート８０™、ＨＣＯ－５０）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸

ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（９）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

（ｉ）本発明の抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法、

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法を提供する。

上記（ｉｉ）においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のＮ端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のＣ端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のレセプター蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のＦ(ａｂ')$_2$ 、Ｆａｂ'、あるいはＦａｂ画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、レセプター蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後に記載するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔^{125}Ｉ〕、〔^{131}Ｉ〕、〔^{3}Ｈ〕、〔^{14}Ｃ〕などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、

あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるレセプター蛋白質等の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプター蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、レセプター蛋白質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（Ｆ）と抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ，Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識

量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江　寛編「ラジオイムノアッセイ〕（講談社、昭和４９年発行）、入江　寛編「続ラジオイムノアッセイ〕（講談社、昭和５４年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和５３年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第２版）（医学書院、昭和５７年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第３版）（医学書院、昭和６２年発行）、「メソッズ・イン・エンジモノジー（Methods in ENZYMOLOGY）」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプター蛋白質またその塩を定量することによって、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプター蛋白質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明の

レセプター蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプター蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明のレセプター蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

（１０）細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

（ｉ）非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(iii) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

(iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの

量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの定量は具体的には以下のようにして行なう。

（ｉ）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンＸ１００^{TM}、ツイーン２０^{TM}など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter－Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速（５００ｒｐｍ～３０００ｒｐｍ）で短時間（通常、約１分～１０分）遠心し、上清をさらに高速（１５０００ｒｐｍ～３００００ｒｐｍ）で通常３０分～２時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様にして行なうことができ、

ウエスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。

（ii）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することができる。

細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングは、

（ｉ）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（３０分前～２４時間前、好ましくは３０分前～１２時間前、より好ましくは１時間前～６時間前）もしくは一定時間後（３０分後～３日後、好ましくは１時間後～２日後、より好ましくは１時間後～２４時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（３０分後～３日後、好ましくは１時間後～２日後、より好ましくは１時間後～２４時間後）、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができ、

（ii）形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（１日後～７日後、好ましくは１日後～３日後、より好ましくは２日後～３日後）、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行なう。

（iii）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質

を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。

（iv）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、Ｇ蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca^{2+}遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、（ロ）細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（１１）細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラ

チン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート８０$^{\mathrm{TM}}$、ＨＣＯ－５０）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異

なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（６０ｋｇとして）においては、一日につき約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（１２）本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体による中和

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の、それらレセプター蛋白質などに対する中和活性とは、すなわち、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。したがって、該レセプター蛋白質の過剰発現などに起因する疾患の予防および／または治療に用いることができる。

（１３）本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするＤＮＡを有する動物の作製

本発明のＤＮＡを用いて、本発明のレセプター蛋白質等を発現するトランスジェニック動物を作製することができる。動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する場合がある）が挙げれるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明のＤＮＡを対象動物に転移させるにあたっては、該ＤＮＡを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のＤＮＡを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のＤＮＡを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へ

マイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター蛋白質等を高産生するＤＮＡ転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するＮＧＦ遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のＤＮＡの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。ＤＮＡ転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプター蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する。

本発明のＤＮＡ転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該ＤＮＡ保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的ＤＮＡを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該ＤＮＡを有するように繁殖継代することができる。

本発明のＤＮＡが転移された動物は、本発明のレセプター蛋白質等が高発現させられているので、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のＤＮＡ転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のＤＮＡ転移マウスの組織中のＤＮＡもしくはＲＮＡを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプター蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプター蛋白質等について分析することができる。本発明のレセプター蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプター蛋白質等を単離精製することも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC－IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	：デオキシリボ核酸
cDNA	：相補的デオキシリボ核酸
A	：アデニン
T	：チミン
G	：グアニン
C	：シトシン
RNA	：リボ核酸
mRNA	：メッセンジャーリボ核酸
dATP	：デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	：デオキシチミジン三リン酸
dGTP	：デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	：デオキシシチジン三リン酸
ATP	：アデノシン三リン酸
EDTA	：エチレンジアミン四酢酸
SDS	：ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	：グリシン
Ala	：アラニン
Val	：バリン
Leu	：ロイシン
Ile	：イソロイシン
Ser	：セリン
Thr	：スレオニン
Cys	：システイン

Ｍｅｔ　：メチオニン
Ｇｌｕ　：グルタミン酸
Ａｓｐ　：アスパラギン酸
Ｌｙｓ　：リジン
Ａｒｇ　：アルギニン
Ｈｉｓ　：ヒスチジン
Ｐｈｅ　：フェニルアラニン
Ｔｙｒ　：チロシン
Ｔｒｐ　：トリプトファン
Ｐｒｏ　：プロリン
Ａｓｎ　：アスパラギン
Ｇｌｎ　：グルタミン
ｐＧｌｕ　：ピログルタミン酸
＊　：終止コドンに対応する
Ｍｅ　：メチル基
Ｅｔ　：エチル基
Ｂｕ　：ブチル基
Ｐｈ　：フェニル基
ＴＣ　：チアゾリジン－４（Ｒ）－カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Ｔｏｓ　：ｐ－トルエンスルフォニル
ＣＨＯ　：ホルミル
Ｂｚｌ　：ベンジル
Cl_2Bzl　：２，６－ジクロロベンジル
Ｂｏｍ　：ベンジルオキシメチル
Ｚ　：ベンジルオキシカルボニル
Ｃｌ－Ｚ　：２－クロロベンジルオキシカルボニル

Ｂｒ－Ｚ	：２－ブロモベンジルオキシカルボニル
Ｂｏｃ	：ｔ－ブトキシカルボニル
ＤＮＰ	：ジニトロフェノール
Ｔｒｔ	：トリチル
Ｂｕｍ	：ｔ－ブトキシメチル
Ｆｍｏｃ	：Ｎ－９－フルオレニルメトキシカルボニル
ＨＯＢｔ	：１－ヒドロキシベンズトリアゾール
ＨＯＯＢｔ	：３，４－ジヒドロ－３－ヒドロキシ－４－オキソ－１，２，３－ベンゾトリアジン
ＨＯＮＢ	：１－ヒドロキシ－５－ノルボルネン－２，３－ジカルボキシイミド
ＤＣＣ	：Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

配列番号：１

本発明のヒト由来の新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質ＴＧＲ５のアミノ酸配列を示す。

配列番号：２

本発明のヒト由来の新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質ＴＧＲ５をコードするｃＤＮＡの塩基配列を示す。

配列番号：３

以下の実施例１におけるＰＣＲ反応で使用したプライマー１の塩基配列を示す。

配列番号：４

以下の実施例１におけるＰＣＲ反応で使用したプライマー２の塩基配列を示す。

配列番号：５

以下の実施例２におけるＰＣＲ反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

配列番号：６

以下の実施例２におけるＰＣＲ反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

配列番号：７

以下の実施例２におけるＰＣＲ反応で使用したプローブの塩基配列を示す。

以下の実施例１で得られた形質転換体エシェリヒア　コリ（Escherichia coli）ＪＭ１０９／ｐＣＲ４－ｈＴＧＲ５は、平成１２（２０００）年4月3日から茨城県つくば市東１－１－１　中央第６の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（ＩＰＯＤ）に寄託番号ＦＥＲＭ ＢＰ－７１１４として、平成１２（２０００）年3月２３日から大阪府大阪市淀川区十三本町２－１７－８５の財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６４１０として寄託されている。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

実施例１

ヒト脾臓のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするｃＤＮＡのクローニングと塩基配列の決定

ヒト脾臓ｃＤＮＡ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を鋳型とし、２個のプライマー、プライマー１（配列番号：３）およびプライマー２（配列番号：４）を用いてＰＣＲ反応を行った。該反応における反応液の組成は上記ｃＤＮＡを１／１０量鋳型として使用し、Ａｄｖａｎｔａｇｅ－ＧＣ２ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｍｉｘ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）１／５０量、プライマー１（配列番号：３）およびプライマー２（配列番号：４）を各０.５μＭ、ｄＮＴＰｓ２００μＭ、および酵素に添付のバッファーを１／５量、ＧＣ Ｍｅｌｔを１／５量加え、２０μｌの液量とした。ＰＣＲ反応は、９４℃・５分の後、９４℃・３０秒、６０℃・３０秒、６８℃・２分のサイクルを３０回繰り返し、最後に６８℃・５分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をＴＡクローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）の処方に従いプラスミドベクターｐＣＲ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）へサブクローニングした。これを大腸菌ＪＭ１０９に導入し、ｃＤＮＡを持つクローンをアンピシリンを含むＬＢ寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするｃＤＮＡ配列（配列番

号：２）を得た。このｃＤＮＡにより導き出されるアミノ酸配列（配列番号：１）を有する新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質をＴＧＲ５と命名した。また配列番号：２で表わされるＤＮＡを含有する形質転換体を大腸菌（Escherichia coli）ＪＭ１０９／ｐＣＲ４－ｈＴＧＲ５と命名した。

配列番号３：GATGACGCCCAACAGCACTGGCGAGGTGCC

配列番号４：TTAGTTCAAGTCCAGGTCGACACTGCTTTGG

図１～図４に、得られた塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

図５にＴＧＲ５の疎水性プロット図を示す。

実施例２

ＴＧＲ５のヒト組織における発現分布解析

ＴＧＲ５のヒト組織における発現分布解析はＴａｑＭａｎ ＰＣＲ法を用いることにより調べた。鋳型として、Ｈｕｍａｎ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｔｉｓｓｕｅ ｃＤＮＡ Ｐａｎｅｌ（クロンテック社）を用い、２種のプライマー（配列番号：５および配列番号：６）、およびプローブ（配列番号：７）を使用してＴａｑＭａｎ ＰＣＲを行った。該反応における反応液組成は、ＴａｑＭａｎ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（アプライドバイオシステムズジャパン）を１２．５μｌ、１０μＭ の２種のプライマーを各０．５μｌ、５μＭのプローブを１μｌ、鋳型を２μｌ、蒸留水を８．５μｌの合計２５μｌであった。ＰＣＲ反応は、５０℃・２分、９５℃・１０分保持した後、９５℃・１５秒、６０℃・１分のサイクルを４０回繰り返した。得られた結果を基にｃＤＮＡ １μｌ当たりのコピー数として算出した結果を図６に示す。これよりＴＧＲ５の発現量は、脾臓および白血球で高く発現していることがわかった。

産業上の利用可能性

本発明のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡおよびそれらの誘導体）は、①リガンド（アゴニスト）の決定、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプター蛋白質の発現系

の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやＰＣＲプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

請求の範囲

１．配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

２．請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

３．請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

４．ＤＮＡである請求項３記載のポリヌクレオチド。

５．配列番号：２で表される塩基配列を有する請求項３記載のポリヌクレオチド。

６．請求項３記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

７．請求項６記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。

８．請求項７記載の形質転換体を培養し、請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。

９．請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項２記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

１０．請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である請求項９記載の抗体。

１１．請求項９記載の抗体を含有してなる診断薬。

１２．請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項２記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド。

１３．請求項１２記載のＧ蛋白質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬。

１４．請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項２記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

１５．請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項２記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

１６．請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項２記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

１７．請求項１５記載のスクリーニング方法または請求項１６記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

１８．請求項１５記載のスクリーニング方法または請求項１６記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

１９．請求項３記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

２０．請求項３記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド。

２１．請求項３記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質のｍＲＮＡの定量方法。

２２．請求項９記載の抗体を用いることを特徴とする請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法。

２３．請求項２１または請求項２２記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断方法。

２４．請求項２１記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

２５．請求項２２記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における請求

項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

２６．請求項２４記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩。

２７．請求項２５記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩。

２８．請求項２４記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

２９．請求項２５記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

３０．中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療剤である請求項１８、２８または２９記載の医薬。

３１．哺乳動物に対して、請求項１５記載のスクリーニング方法または請求項１６記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療方法。

３２．哺乳動物に対して、請求項２４記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療方法。

３３．哺乳動物に対して、請求項２５記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療方法。

３４．中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療剤を製

造するための請求項１５記載のスクリーニング方法または請求項１６記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用。

３５．中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療剤を製造するための請求項２４記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の使用。

３６．中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌または糖尿病の予防・治療剤を製造するための請求項２５記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項１記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の使用。

図1

```
        9           18          27          36          45          54
ATG ACG CCC AAC AGC ACT GGC GAG GTG CCC AGC CCC ATT CCC AAG GGG GCT TTG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 M   T   P   N   S   T   G   E   V   P   S   P   I   P   K   G   A   L

        63          72          81          90          99          108
GGG CTC TCC CTG GCC CTG GCA AGC CTC ATC ATC ACC GCG AAC CTG CTC CTA GCC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 G   L   S   L   A   L   A   S   L   I   I   T   A   N   L   L   L   A

        117         126         135         144         153         162
CTG GGC ATC GCC TGG GAC CGC CGC CTG CGC AGC CCA CCT GCT GGC TGC TTC TTC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 L   G   I   A   W   D   R   R   L   R   S   P   P   A   G   C   F   F

        171         180         189         198         207         216
CTG AGC CTA CTG CTG GCT GGG CTG CTC ACG GGT CTG GCA TTG CCC ACA TTG CCA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 L   S   L   L   L   A   G   L   L   T   G   L   A   L   P   T   L   P

        225         234         243         252         261         270
GGG CTG TGG AAC CAG AGT CGC CGG GGT TAC TGG TCC TGC CTC CTC GTC TAC TTG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 G   L   W   N   Q   S   R   R   G   Y   W   S   C   L   L   V   Y   L
```

図２

279 288 297 306 315 324
GCT CCC AAC TTC TCC TTC CTC TCC CTG CTT GCC AAC CTC TTG CTG GTG CAC GGG
A P N F S F L S L L A N L L L V H G

333 342 351 360 369 378
GAG CGC TAC ATG GCA GTC CTG AGG CCA CTC CAG CCC CCT GGG AGC ATT CGG CTG
E R Y M A V L R P L Q P P G S I R L

387 396 405 414 423 432
GCC CTG CTC CTC ACC TGG GCT GGT CCC CTG CTC TTT GCC AGT CTG CCC GCT CTG
A L L L T W A G P L L F A S L P A L

441 450 459 468 477 486
GGG TGG AAC CAC TGG ACC CCT GGT GCC AAC TGC AGC TCC CAG GCT ATC TTC CCA
G W N H W T P G A N C S S Q A I F P

495 504 513 522 531 540
GCC CCC TAC CTG TAC CTC GAA GTC TAT GGG CTC CTG CTG CCC GCC GTG GGT GCT
A P Y L Y L E V Y G L L L P A V G A

図3

```
        549         558         567         576         585         594
GCT GCC TTC CTC TCT GTC CGC GTG CTG GCC ACT GCC CAC CGC CAG CTG CAG GAC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 A   A   F   L   S   V   R   V   L   A   T   A   H   R   Q   L   Q   D

        603         612         621         630         639         648
ATC TGC CGG CTG GAG CGG GCA GTG TGC CGC GAT GAG CCC TCC GCC CTG GCC CGG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 I   C   R   L   E   R   A   V   C   R   D   E   P   S   A   L   A   R

        657         666         675         684         693         702
GCC CTT ACC TGG AGG CAG GCA AGG GCA CAG GCT GGA GCC ATG CTG CTC TTC GGG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 A   L   T   W   R   Q   A   R   A   Q   A   G   A   M   L   L   F   G

        711         720         729         738         747         756
CTG TGC TGG GGG CCC TAC GTG GCC ACA CTG CTC CTC TCA GTC CTG GCC TAT GAG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 L   C   W   G   P   Y   V   A   T   L   L   L   S   V   L   A   Y   E

        765         774         783         792         801         810
CAG CGC CCG CCA CTG GGG CCT GGG ACA CTG TTG TCC CTC CTC TCC CTA GGA AGT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Q   R   P   P   L   G   P   G   T   L   L   S   L   L   S   L   G   S
```

図4

```
        819             828             837             846             855             864
GCC AGT GCA GCG GCA GTG CCC GTA GCC ATG GGG CTG GGC GAT CAG CGC TAC ACA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 A   S   A   A   A   V   P   V   A   M   G   L   G   D   Q   R   Y   T

        873             882             891             900             909             918
GCC CCC TGG AGG GCA GCC GCC CAA AGG TGC CTG CAG GGG CTG TGG GGA AGA GCC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 A   P   W   R   A   A   A   Q   R   C   L   Q   G   L   W   G   R   A

        927             936             945             954             963             972
TCC CGG GAC AGT CCC GGC CCC AGC ATT GCC TAC CAC CCA AGC AGC CAA AGC AGT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 S   R   D   S   P   G   P   S   I   A   Y   H   P   S   S   Q   S   S

        981             990
GTC GAC CTG GAC TTG AAC TAA
--- --- --- --- --- --- ---
 V   D   L   D   L   N   *
```

図５

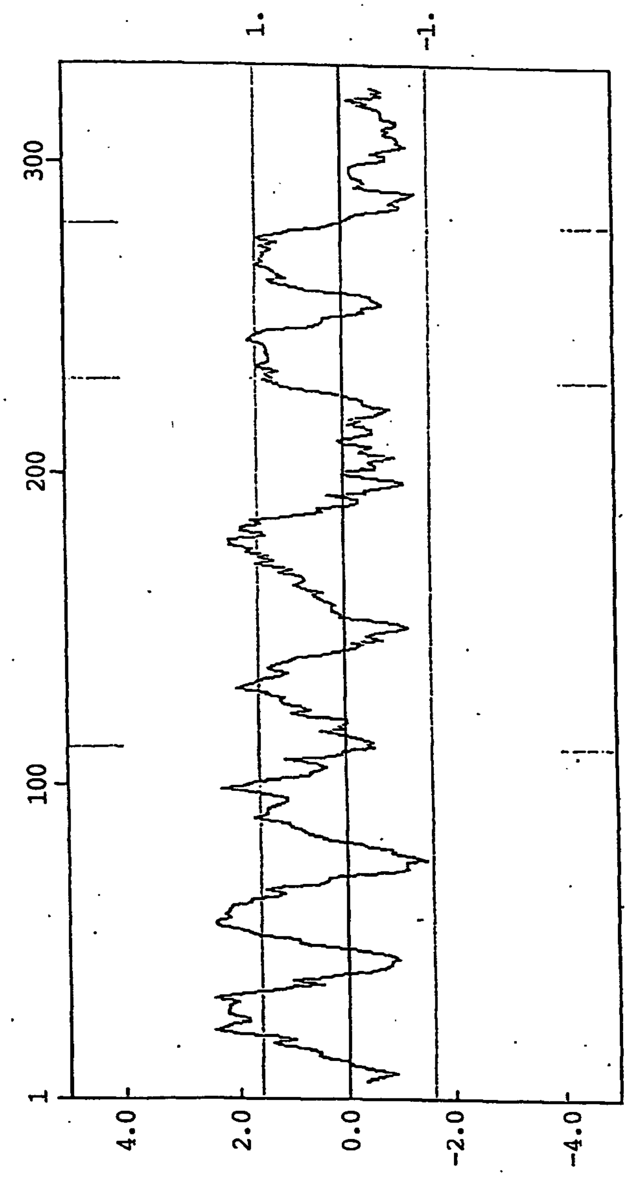
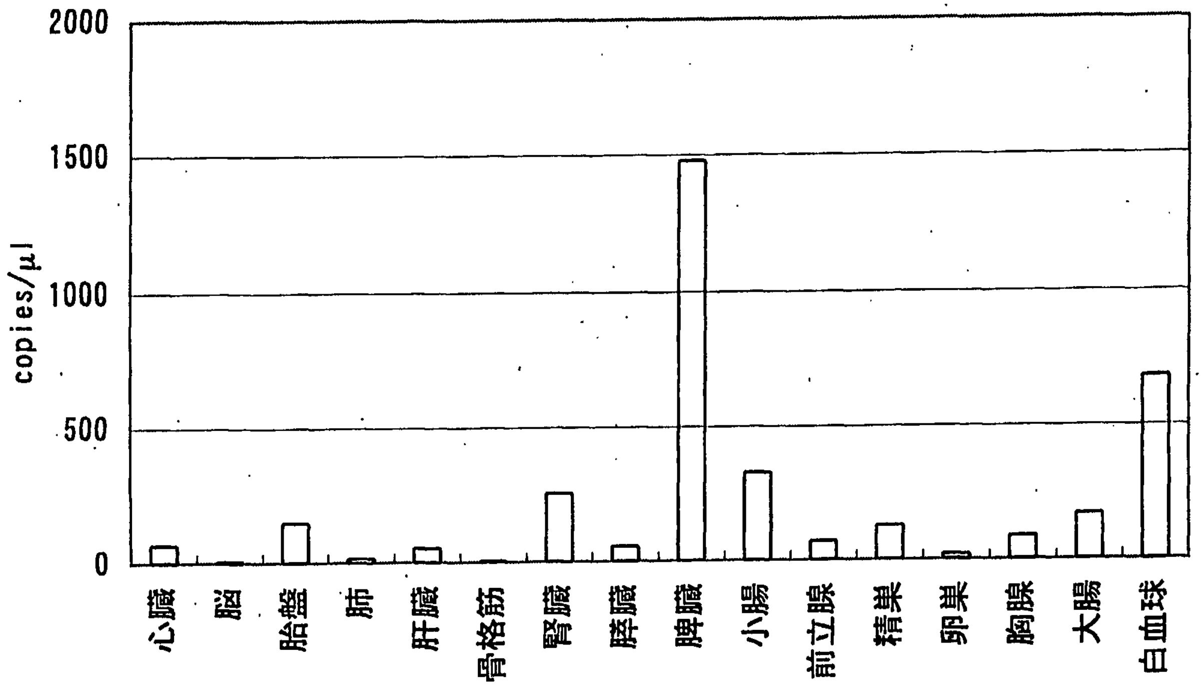


図6

CLONTECH Human Multiple Tissue cDNA Panelでの発現量



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G Protein Coupled Receptor and its DNA

<130> 662521

<150> JP 2000-110765

<151> 2000-04-12

<160> 7

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

```
Met Thr Pro Asn Ser Thr Gly Glu Val Pro Ser Pro Ile Pro Lys Gly
                5                   10                  15
Ala Leu Gly Leu Ser Leu Ala Leu Ala Ser Leu Ile Ile The Ala Asn
            20                  25                  30
Leu Leu Leu Ala Leu Gly Ile Ala Trp Asp Arg Arg Leu Arg Ser Pro
        35                  40                  45
Pro Ala Gly Cys Phe Phe Leu Ser Leu Leu Leu Ala Gly Leu Leu Thr
    50                  55                  60
Gly Leu Ala Leu Pro Thr Leu Pro Gly Leu Trp Asn Gln Ser Arg Arg
65                  70                  75                  80
Gly Tyr Trp Ser Cys Ler Ler Val Tyr Leu Ala Pro Asn Phe Ser Phe
                85                  90                  95
Leu Ser Leu Leu Ala Asn Leu Leu Leu Val His Gly Glu Arg Tyr Met
            100                 105                 110
Ala Val Leu Arg Pro Leu Gln Pro Pro Gly Ser Ile Arg Leu Ala Leu
        115                 120                 125
```

Leu Leu Thr Trp Ala Gly Pro Leu Leu Phe Ala Ser Leu Pro Ala Leu

130 135 140

Gly Trp Asn His Trp Thr Pro Gly Ala Asn Cys Ser Ser Cln Ala Ile

145 150 155 160

Phe Pro Ala Pro Tyr Leu Tyr Leu Glu Val Tyr Gly Leu Leu Leu Pro

165 170 175

Ala Val Gly Ala Ala Ala Phe Leu Ser Val Arg Val Leu Ala Thr Ala

180 185 190

His Arg Gln Leu Gln Asp Ile Cys Arg Leu Glu Arg Ala Val Cys Arg

195 200 205

Asp Glu Pro Ser Ala Leu Ala Arg Ala Leu Thr Trp Arg Gln Ala Arg

210 215 220

Ala Gln Ala Gly Ala Met Leu Leu Phe Gly Leu Cys Trp Gly Pro Tyr

225 230 235 240

Val Ala The Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Tyr Glu Gln Arg Pro Pro

245 250 255

Leu Gly Pro Gly The Leu Leu Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Ala Ser

260 265 270

Ala Ala Ala Val Pro Val Ala Met Gly Leu Gly Asp Gln Arg Tyr Thr

275 280 285

Ala Pro Tyr Arg Ala Ala Ala Gln Arg Cys Leu Gln Gly Leu Trp Gly

290 295 300

Arg Ala Ser Arg Asp Ser Pro Gly Pro Ser Ile Ala Tyr His Pro Ser

305 310 315 320

Ser Gln Ser Ser Val Asp Ler Asp Ler Asn

325 330

<210> 2

<211> 990

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

atgacgccca acagcactgg cgaggtgccc agccccattc ccaagggggc tttggggctc 60

tccctggccc tggcaagcct catcatcacc gcgaacctgc tcctagccct gggcatcgcc 120

tgggaccgcc gcctgcgcag cccacctgct ggctgcttct tcctgagcct actgctggct 180

gggctgctca cgggtctggc attgcccaca ttgccagggc tgtggaacca gagtcgccgg 240

ggttactggt cctgcctcct cgtctacttg gctcccaact tctccttcct ctccctgctt 300

gccaacctct tgctggtgca cggggagcgc tacatggcag tcctgaggcc actccagccc 360

cctgggagca ttcggctggc cctgctcctc acctgggctg gtcccctgct ctttgccagt 420

ctgcccgctc tggggtggaa ccactggacc cctggtgcca actgcagctc ccaggctatc 480

ttcccagccc cctacctgta cctcgaagtc tatgggctcc tgctgcccgc cgtgggtgct 540

gctgccttcc tctctgtccg cgtgctggcc actgcccacc gccagctgca ggacatctgc 600

cggctggagc gggcagtgtg ccgcgatgag ccctccgccc tggcccgggc ccttacctgg 660

aggcaggcaa gggcacaggc tggagccatg ctgctcttcg ggctgtgctg gggcccctac 720

gtggccacac tgctcctctc agtcctggcc tatgagcagc gcccgccact ggggcctggg 780

acactgttgt ccctcctctc cctaggaagt gccagtgcag cggcagtgcc cgtagccatg 840

gggctgggcg atcagcgcta cacagccccc tggagggcag ccgcccaaag gtgcctgcag 900

gggctgtggg gaagagcctc ccgggacagt cccggcccca gcattgccta ccacccaagc 960

agccaaagca gtgtcgacct ggacttgaac 990

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR5

<400> 3

gatgacgccc aacagcactg gcgaggtgcc 30

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR5

<400> 4

ttagttcaag tccaggtcga cactgctttg g 31

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

ttggctccca acttctcctt c 21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

ctggagtggc ctcaggactg 20

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 7

tccctgcttg ccaacctctt gctg 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/03143

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl^7 C12N 15/12, C07K 14/705, C07K 16/28, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12Q 1/68, A61K 45/00, A61P 25/00, A61P 29/00, A61P 35/00, A61P 11/06, A61P 9/00, G01N 33/53, G01N 33/566, G01N 33/15, G01N 33/50, // C12P 21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl^7 C12N 15/12, C07K 14/705, C07K 16/28, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICST FILE(JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 99/66041, A1 (HUMAN GENOME SCI.INC.), 23 December, 1999 (23.12.99), Seq.Nos.87,206,453,457 & AU, 9946829, A & EP, 1088071, A1	1-16,19-22, 24-25
A	WO, 00/15973, A2 (INCYTE PHARM. INC.), 23 March, 2000 (23.03.00) & AU, 9960359, A	1-16,19-22, 24-25
A	WO, 00/08199, A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 17 February, 2000 (17.02.00), & US 6031090,A	1-16,19-22, 24-25
A	WO, 00/08133, A1 (MERCK & CO.INC.), 17 February, 2000 (17.02.00) (Family: none)	1-16,19-22, 24-25
A	WO, 00/04045, A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 27 January, 2000 (27.01.00) & EP, 1098904, A1	1-16,19-22, 24-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 May, 2001 (30.05.01)

Date of mailing of the international search report
12 June, 2001 (12.06.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/03143

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 23,31-33
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy or diagnostic methods.

2. ☒ Claims Nos.: 17-18.26-30.35-36
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning "ligand which can be selected by using a screening method or a screening kit" and "compound" as stated in these claims, it is unclear what compounds are involved in the scopes thereof though the statement in the description is taken into consideration. Thus, no international search can be practiced on these claims.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP01／03143

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. Cl^7　C12N 15/12, C07K 14/705, C07K 16/28, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12Q 1/68, A61K 45/00, A61P 25/00, A61P 29/00, A61P 35/00, A61P 11/06, A61P 9/00, G01N 33/53, G01N 33/566, G01N 33/15, G01N 33/50, // C12P 21/02

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. Cl^7　C12N 15/12, C07K 14/705, C07K 16/28, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICSTﾌｧｲﾙ(JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	WO, 99/66041, A1 (HUMAN GENOME SCI. INC.) 23. 12月. 1999 (23. 12. 99) Seq. No. 87, Seq. No. 206, Seq. No. 453及びSeq. No. 457参照 & AU, 9946829, A & EP, 1088071, A1	1-16, 19-22, 24-25
A	WO, 00/15973, A2 (INCYTE PHARM. INC.) 23. 3月. 2000 (23. 03. 00) & AU, 9960359, A	1-16, 19-22, 24-25
A	WO, 00/08199, A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 17. 2月. 2000 (17. 02. 00) & US 6031090, A	1-16, 19-22, 24-25

☒　C欄の続きにも文献が列挙されている。　　□　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　30. 05. 01

国際調査報告の発送日　12.06.01

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ISA／JP）
郵便番号100－8915
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　4N　3038
鈴木　恵理子

電話番号　03－3581－1101　内線　3448

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０１／０３１４３

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO,00/08133,A1(MERCK & CO.INC.)17.2月.2000(17.02.00)，（ファミリーなし）	1-16,19-22, 24-25
A	WO,00/04045,A1(SMITHKLINE BEECHAM CORP.)27.1月.2000 (27.01.00) & EP,1098904,A1	1-16,19-22, 24-25

第Ｉ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☒　請求の範囲　23,31-33　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
前記請求の範囲の発明は、人の身体の治療方法又は診断方法に関するものである。

２．☒　請求の範囲　17-18,26-30,35-36　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
前記請求の範囲に記載の「スクリーニング方法またはスクリーニングキットを用いて選られうるリガンド」及び「化合物」について、明細書の記載を参酌しても、どのような範囲の化合物が包含されるのか不明であるので、前記請求の範囲については、国際調査をすることができない。

３．□　請求の範囲　＿＿＿＿＿＿＿＿　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第II欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．□　出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

２．□　追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．□　出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

４．□　出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
□　追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
□　追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。